Vitamin B_{12}

Français – 2001-07 – 1926306001 05 04

11820753 **100 tests**

Domaine d'utilisation
Test immunologique pour la détermination quantitative *in vitro* de la vitamine B_{12} dans le sérum et le plasma humains.
Ce test par électrochimiluminescence "ECLIA" est adapté aux dosages immunologiques sur les analyseurs Elecsys 2010 et MODULAR ANALYTICS E170 (module Elecsys) de Roche.

Tous les appareils ne sont pas disponibles dans tous les pays.

Généralités*
Les anémies nutritionnelles et macrocytaires peuvent être dues à une carence en vitamine B_{12}. Cette carence peut résulter de régimes dépourvus de viande et de produits bactériens, de l'alcoolisme ou de troubles structurels/fonctionnels des processus de digestion ou d'absorption (formes d'anémie pernicieuse). La malabsorption est la principale cause de cette carence et peut être due à une insuffisance pancréatique, une atrophie gastrique ou une gastrectomie, des lésions intestinales, une perte des protéines de liaison de la vitamine B_{12} dans l'intestin (facteur intrinsèque), la production d'autoanticorps anti-facteur intrinsèque ou des causes liées.[1] Cette vitamine est nécessaire pour un métabolisme normal, la synthèse de l'ADN et la régénération des globules rouges. Les carences en vitamine B_{12} non traitées conduisent à l'anémie mégaloblastique et provoquent une dégénérescence irréversible du système nerveux central. Les dosages de vitamine B_{12} et d'acide folique présentent un intérêt diagnostic pour le dépistage de carences en vitamine B_{12} ou en acide folique, en particulier dans le cadre du diagnostic différenciel de l'anémie mégaloblastique.
Les premiers tests radiologiques pour le dosage de la vitamine B_{12} datent de 1961.[3,4] Tous utilisent des traceurs marqués à la ^{57}Co-cyanocobalamine et du facteur intrinsèque pour la liaison de la vitamine B_{12}. Les tests disponibles dans le commerce se distinguent par leurs techniques de séparation (libre et liée) et par leurs méthodes de prétraitement de l'échantillon. La présence de protéines sériques de liaison endogènes pour la cyanocobalamine (transcobalamines, y compris protéine R) et d'immunoglobulines anti-facteur intrinsèque nécessite que les échantillons soient portés à ébullition ou traités à un pH alcalin afin de libérer la vitamine B_{12} et détruire les protéines de liaison. A la fin des années 1970, les tests radiologiques utilisant les protéines de liaison sériques ou un facteur intrinsèque partiellement purifié donnaient des concentrations de vitamine B_{12} dépassant celles déterminées par les méthodes microbiologiques, ceci étant lié à la présence de protéines de liaison sérique ou de protéines R dans le test. La spécificité de la protéine R est médiocre en comparaison à celle du facteur intrinsèque et les analogues de la vitamine B_{12} elle-même.[5–8] Depuis lors, des recommandations ont prévu l'utilisation de facteur intrinsèque hautement purifié dans l'industrie.
Le test Vitamine B_{12} Elecsys utilise le principe par compétition avec du facteur intrinsèque spécifique de la vitamine B_{12}. La vitamine B_{12} de l'échantillon entre en compétition avec la vitamine B_{12} biotinylée ajoutée pour les sites de fixation du facteur intrinsèque marqué au ruthénium**.

**$(Ru(bpy)_3^{2+})$: Tris(2,2'-bipyridyl)ruthénium(II)

Principe*
Principe par compétition. Durée totale du cycle analytique : 27 minutes.
- 1ère incubation: Une prise d'échantillon de 15 µl est incubée avec les réactifs de prétraitement 1 et 2 de la vitamine B_{12}. La vitamine B_{12} est libérée dans le sérum.
- 2e incubation: L'échantillon prétraité est incubé avec du facteur intrinsèque marqué au ruthénium. Il se forme un complexe vitamine B_{12}-protéine de liaison, dont la quantité dépend de la concentration de l'analyte dans l'échantillon.
- 3e incubation: Les microparticules tapissées de streptavidine et la vitamine B_{12} biotinylée sont ajoutées. Les sites de fixation libres du facteur intrinsèque marqué au ruthénium sont occupés; il se forme un complexe facteur intrinsèque marqué au ruthénium-vitamine B_{12} biotinylée. Le complexe est lié à la phase solide par une liaison biotine-streptavidine.
- Le mélange réactionnel est aspiré dans la cellule de mesure, les microparticules sont maintenues au niveau de l'électrode par un aimant. L'élimination de la fraction libre est effectuée par le passage de ProCell. Une différence de potentiel appliquée à l'électrode déclenche la production de luminescence qui est mesurée par un photomultiplicateur.
- Les résultats sont obtenus à l'aide d'une courbe de calibration. Une courbe de référence est mémorisée dans le code barres du réactif et est réajustée, pour l'analyseur utilisé, par une calibration en deux points.

Réactifs – Contenu du coffret et concentrations
Coffret Vitamine B_{12} Elecsys, Réf. 11820753 pour 100 tests
PT1 Réactif de prétraitement 1 (bouchon blanc), 1 flacon contenant 4,0 ml : dithiothréitol 1,028 g/l ; agent stabilisant ; pH 5,5.
PT2 Réactif de prétraitement 2 (bouchon gris), 1 flacon contenant 4,0 ml : hydroxyde de sodium 36 g/l; cyanure de sodium 2,205 g/l.
M Microparticules tapissées de streptavidine (bouchon transparent), 1 flacon contenant 6,5 ml: microparticules tapissées de streptavidine 0,72 mg/ml ; capacité de liaison : 470 ng biotine/mg microparticules ; conservateur.
R1 Facteur intrinsèque~$Ru(bpy)_3^{2+}$ (bouchon gris), 1 flacon contenant 10,0 ml : facteur intrinsèque de porc marqué au ruthénium 4 µg/l; cobinamide dicyanide 15 µg/l ; agent stabilisant ; sérumalbumine humaine, tampon phosphate, pH 5,5 ; conservateur.
R2 Vitamine B_{12}~biotine (bouchon noir), 1 flacon contenant 8,5 ml : vitamine B_{12} marquée à la biotine 25 µg/l ; biotine 3 µg/l ; tampon phosphate, pH 7,0; conservateur.

Précautions d'emploi et mises en garde
Pour diagnostic *in vitro*.
Observer les précautions habituelles de manipulation en laboratoire.
L'élimination de tous les déchets doit être effectuée conformément aux dispositions légales.
Ce coffret contient parmi ses constituants les substances suivantes classées selon la directive 88/379/CEE:
PT2: C - CORROSIF, R 34, S 26, 37/39 (hydroxyde de sodium)
En cas de contact avec les yeux, laver immédiatement et abondamment avec de l'eau et consulter un spécialiste. Provoque des brûlures. Porter des gants appropriés et un appareil de protection des yeux/du visage.
Xn - NOCIF, R 20/21/22, S 45 (cyanure de sodium)
Nocif par inhalation, par contact avec la peau et par ingestion. En cas d'accident ou de malaise consulter immédiatement un médecin (si possible lui montrer l'étiquette).
Les produits d'origine humaine ont fait l'objet d'une recherche des anticorps anti-HIV 1, anti-HIV 2, anti-HCV, et de l'antigène HBs ayant conduit à un résultat négatif. Comme le risque d'infection ne peut être exclu avec certitude par aucune méthode, ce produit doit être utilisé avec le même soin que les échantillons de patients. En cas d'exposition, suivre les directives de l'autorité compétente en matière de santé.[9,10]

Préparation des réactifs*
Les réactifs contenus dans le coffret sont prêts à l'emploi et ne peuvent être utilisés séparément. Toutes les informations nécessaires au déroulement du test sont mémorisées sur les codes barres des flacons réactifs et sont saisies automatiquement.

Conservation et stabilité*
Ranger le coffret Vitamine B_{12} Elecsys entre 2 et 8°C **en position verticale**, de manière à ce que toutes les microparticules soient rassemblées lors de l'homogénéisation qui précède l'analyse.
Stabilité :
Avant ouverture, entre 2 et 8°C : jusqu'à la date de péremption indiquée.
Après ouverture, entre 2 et 8°C : douze semaines
Sur E170 et Elecsys 2010 : huit semaines

Prélèvement et préparation des échantillons*
Seuls les échantillons suivants ont été testés :
Sérum recueilli sur tubes standard ou tubes contenant un gel séparateur.
Plasma recueilli sur héparinate de sodium ou EDTA tripotassique.
En cas d'utilisation de plasma recueilli sur citrate de sodium ou fluorure de sodium/oxalate de potassium, on obtient des résultats de 23 % plus faibles qu'avec le sérum (critère d'acceptabilité: recouvrement 90–110% de la valeur du sérum ou pente 0,9–1,1 + coefficient de corrélation >0,95 + ordonnée à l'origine <± 2 x limite de détection analytique).
Stabilité : deux jours entre 2 et 8°C, deux mois à –20°C. Ne congeler qu'une fois. Conserver à l'abri de la lumière.
Stabilité du sérum recueilli sur tubes à gel séparateur : 24 heures entre 2 et 8°C (selon les indications données par le fabricant des tubes).[11]
Les échantillons qui contiennent un précipité doivent être centrifugés avant l'analyse.
Ne pas utiliser d'échantillons inactivés par la chaleur.
Ne pas utiliser d'échantillons ou solutions de contrôles stabilisés par de l'azide.
Les échantillons destinés au dosage de la vitamine B_{12} doivent être prélevés sur des personnes à jeun.
S'assurer avant l'analyse que la température des échantillons, des calibrateurs et des contrôles se situe à 20–25°C.
En raison des risques d'évaporation, il est recommandé de doser les échantillons, les contrôles et les calibrateurs dans les deux heures qui suivent leur mise en place sur les analyseurs.

Vitamine B_{12} Elecsys – Réactifs et matériel nécessaires*
Contenu du coffret
Réf. 11820753, Coffret Vitamine B_{12} Elecsys pour 100 tests
- M Microparticules tapissées de streptavidine
- R1 Facteur intrinsèque~$Ru(bpy)_3^{2+}$
- R2 Vitamine B_{12} ~biotine
- PT1 Réactif de prétraitement 1
- PT2 Réactif de prétraitement 2

Réactifs et matériel auxiliaires nécessaires
- Réf. 11820869, Vitamine B_{12} CalSet Elecsys, 4 x 1 ml
- Réf. 11731416, PreciControl Universal Elecsys : PreciControl Universal 1 pour 2 x 3 ml et PreciControl Universal 2 pour 2 x 3 ml
- Réf. 11732277, Diluent Universal Elecsys, 2 x 18 ml, milieu de dilution de l'échantillon ou
- Réf. 03183971, Diluent Universal Elecsys, 2 x 40 ml, milieu de dilution de l'échantillon
- Equipement habituel de laboratoire
- Elecsys 2010 ou MODULAR ANALYTICS E170

Matériel auxiliaire pour Elecsys 2010 :
- Réf. 11662988, ProCell Elecsys, 6 x 380 ml, tampon système
- Réf. 11662970, CleanCell Elecsys, 6 x 380 ml, solution de nettoyage pour la cellule de mesure
- Réf. 11930346, SysWash Elecsys, 1 x 500 ml, additif à la solution de lavage
- Réf. 11933159, Adaptateur pour SysClean
- Réf. 11706802, Assay Cup Elecsys 2010, 60 x 60 cuvettes réactionnelles
- Réf. 11706799, Assay Tip Elecsys 2010, 30 x 120 embouts de pipette

Matériel auxiliaire pour MODULAR ANALYTICS E170:
- Réf. 12135019, ProCell M, 1 x 2 l, tampon système
- Réf. 12135027, CleanCell M, 1 x 2 l, solution de nettoyage pour la cellule de mesure
- Réf. 03023141, PC/CC-Cups, 50 godets pour la thermorégulation de ProCell M et de CleanCell M
- Réf. 03005712, Probewash M, 12 x 70 ml, solution de lavage pour la fin de la série et pour le rinçage en cas de changement de réactif
- Réf. 03004899, PreClean M, 5 x 600 ml de solution de lavage avant la détection
- Réf. 12102137, AssayCups/AssayTips Combimagazin M, 48 blocs de 84 tubes à essai/embouts de pipettes, sacs pour déchets
- Réf. 03023150, WasteLiner (sacs pour déchets)
- Réf. 03027651, SysClean Adapter M, adaptateur M pour SysClean

Pour les deux appareils:
- Réf. 11298500, SysClean Elecsys, 5 x 100 ml, solution de lavage du système

Disponible uniquement aux Etats-Unis:
- Réf. 11832778, Vitamine B_{12} CalCheck Elecsys, à trois niveaux de concentration

Mode opératoire*
Pour garantir le bon fonctionnement du test, se conformer au mode d'emploi de l'appareil utilisé et vérifier que les réactifs, les solutions auxiliaires et les consommables nécessaires à la réalisation du test sont disponibles en quantité suffisante.
L'analyseur effectue automatiquement l'homogénéisation des microparticules. Les informations spécifiques du test mémorisées sur l'étiquette à code barres doivent être saisies. Si, exceptionnellement, le code barres ne peut être lu par l'appareil, saisir manuellement la série de 15 chiffres inscrits sur l'étiquette.
E170/Elecsys 2010 : porter les réactifs réfrigérés à env. 20°C avant le chargement et les placer dans le plateau réactifs de l'appareil thermostaté à 20°C. Eviter la formation de mousse. L'analyseur gère le contrôle de la température, l'ouverture et la fermeture des flacons.

Calibration*
Le coffret Vitamine B_{12} Elecsys a été calibré par rapport à un test radio-immunologique du commerce pour la détermination de la vitamine B_{12}.[11]
Le code barres du flacon réactif contient toutes les informations spécifiques de la calibration du lot, la courbe de référence y est mémorisée. Le réajustement de la courbe pour l'appareil est effectué à l'aide des 2 solutions Vitamine B_{12} CalSet Elecsys.

Vitamin B_{12}

Français

Fréquence de calibration : Effectuer une calibration par lot en utilisant un réactif frais (ayant été enregistré au maximum 24 heures par l'appareil).
Une nouvelle calibration est recommandée pour :
E170/Elecsys 2010 :
- après un mois (28 jours) pour un même lot de réactifs
- après sept jours pour un même flacon resté sur l'appareil
- quand elle s'avère nécessaire : par ex. si les résultats des sérums de contrôle se situent en dehors des limites de confiance.

Validation de la calibration : Le logiciel de l'appareil vérifie la validité de la courbe et affiche les anomalies.

Contrôle de qualité*
Utiliser PreciControl Universal 1 et PreciControl Universal 2 Elecsys ou d'autres contrôles appropriés. Il est recommandé de doser les sérums de contrôle en simple au moins une fois par 24 heures pendant une routine, pour chaque nouveau coffret et lors d'une calibration. Cette fréquence peut varier selon les exigences du laboratoire. Les résultats doivent se situer dans les limites de confiance.
Chaque laboratoire établira la procédure à suivre si les résultats sont situés en dehors des limites de confiance.

Expression des résultats*
E170 et Elecsys 2010 calculent automatiquement le taux de vitamine B_{12} de chaque échantillon. Les résultats sont exprimés au choix en pg/ml ou en pmol/l.
Facteurs de conversion : pmol/l x 1,36 = pg/ml
pg/ml x 0,738 = pmol/l

Limites d'utilisation – Interférences*[11]
La bilirubine (< 650 mg/l, < 65 mg/dl), l'hémolyse (Hb < 1,0 g/dl), la lipémie (triglycérides < 15 g/l, < 1500 mg/dl) et la biotine (< 50 ng/ml) n'influencent pas le résultat (critère d'acceptabilité: recouvrement ± 10% par rapport à la valeur initiale).
Chez les patients traités par de fortes doses de biotine (> 5 mg/jour), il est recommandé d'effectuer le prélèvement de l'échantillon au moins 8 heures après la dernière administration.[11]
On n'a pas observé d'influence par le facteur rhumatoïde jusqu'à 1500 U/ml.
L'influence de 54 médicaments fréquemment administrés a été recherchée *in vitro* : aucune interférence n'a été observée.
Dans de rares cas, des titres très élevés d'anticorps anti-streptavidine et anti-ruthénium peuvent conduire à des interférences.
Les résultats du test Vitamine B_{12} Elecsys doivent toujours être confrontés aux données de l'anamnèse du patient, au tableau clinique et aux résultats des autres examens pour établir un diagnostic.

Domaine de mesure*[11]
30–2000 pg/ml (22–1476 pmol/l) : défini par la limite de détection et le maximum de la courbe de référence. Les taux situés au-dessous de la limite de détection sont exprimés de la manière suivante : < 30 pg/ml (< 22 pmol/l), et les taux situés au-dessus du domaine de mesure de la manière suivante: > 2000 pg/ml (> 1476 pmol/l).

Dilution des échantillons
Les échantillons présentant une concentration en vitamine B_{12} > 2000 pg/ml peuvent être dilués manuellement au 1/2 dans le Diluent Universal. La concentration obtenue avec l'échantillon dilué doit être >1000 pg/ml (> 738 pmol/l). Multiplier le résultat obtenu par le facteur 2.
Remarque : Une non-linéarité peut être observée pour certains échantillons dilués. Diluent Universal pouvant contenir de faibles quantité de vitamine B_{12}, utiliser, pour les études de linéarité, du sérum humain à faible concentration en analyte. Les échantillons situés en dehors du domaine de mesure peuvent être dilués au 1/2 à l'aide du Diluent Universal. Aux concentrations obtenues après dilution, la vitamine B_{12} endogène n'a pas d'influence significative sur le résultat du test.

Domaines de référence*
Compte tenu de la particularité des habitudes alimentaires, il est recommandé au laboratoire de déterminer ses propres valeurs normales à partir d'un nombre de dosages statistiquement significatif. Les valeurs suivantes, issues de deux études réalisées aux USA et aux Pays-Bas, sont données à titre d'orientation.[11]

Région		(2,5e–97,5e percentiles)	
	n	pg/ml	pmol/l
USA	111	243 – 894	179 – 660
Europe	334	197 – 866	145 – 637

Chaque laboratoire devra vérifier la validité de ces valeurs de référence et établir ses propres valeurs selon la population examinée.

Performances analytiques*[11]
Précision
Les résultats indiqués ci-dessous ont été obtenus avec des analyseurs Elecsys. Les résultats obtenus au laboratoire peuvent différer de ceux-ci.
La précision a été déterminée à l'aide de pools de sérums humains, chaque échantillon a été analysé 6 fois par jour pendant 10 jours (n=60) selon un protocole modifié (EP5-A) du N.C.C.L.S. (National Committee for Clinical Laboratory Standards)[12]; précision intra-série sur E170, n = 21.

Elecsys 2010			**Précision intra-série**			**Précision inter-série**		
Echantillon	x̄		s		CV	s		CV
	pg/ml	pmol/l	pg/ml	pmol/l	%	pg/ml	pmol/l	%
Sérum humain 1	203	150	14,1	10,4	6,9	15,4	11,4	7,6
Sérum humain 2	481	355	20,4	15,1	4,2	21,1	15,6	4,4
Sérum humain 3	1499	1106	41,2	30,4	2,7	47,8	35,2	3,2
Contrôle 1	1119	826	31,3	23,1	2,8	36,2	26,7	3,2
Contrôle 2	471	348	20,2	14,9	4,3	21,5	15,9	4,6

Elecsys® System 2010/MODULAR ANALYTICS E170

E170	**Précision intra-série**					**Précision inter-série**				
Echantillon	x̄		s		CV	x̄		s		CV
	pg/ml	pmol/l	pg/ml	pmol/l	%	pg/ml	pmol/l	pg/ml	pmol/l	%
Sérum humain 1	155	115	3,67	2,71	2,4	157	116	9,52	7,02	6,1
Sérum humain 2	359	265	10,1	7,44	2,8	349	258	12,4	9,17	3,6
Sérum humain 3	1162	858	7,42	5,48	0,6	1128	832	24,8	18,3	2,2
PreciControl U1	667	492	6,29	4,64	0,9	671	495	18,8	13,9	2,8
PreciControl U1	399	294	17,1	12,6	4,3	391	289	16,3	12,1	4,2

Sensibilité (limite de détection analytique)
La limite de détection se situe à 30 pg/ml (22 pmol/l).
La limite de détection correspond au taux le plus faible de vitamine B_{12} mesurable qui puisse être différencié de zéro. Elle représente la concentration du standard le plus faible de la courbe de référence + 2s (calibrateur de référence, standard 1 + 2s, précision intra-série, n = 21).

Spécificité analytique
Le test montre la réaction croisée suivante :
Cobinamide dicyanide 200 ng/ml 0,024 %

Comparaison de méthodes
Une comparaison entre le test Vitamine B_{12} Elecsys (y) et un test immuno-radiologique du commerce pour la détermination de la vitamine B_{12} (x), effectuée sur des sérums de patients hospitalisés, a permis d'établir les corrélations suivantes (pg/ml) :
Nombre d'échantillons analysés : 345

Passing/Bablok[13–15]	Régression linéaire
y = -9,2 + 1,06x	y = 7,4 + 1,02x
r = 0,977	r = 0,977
s (md68) = 45,7	Sy.x = 75,5

Les concentrations des échantillons étaient situées entre env. 30 et 1798 pg/ml ou env. 22 et 1328 pmol/l.

Bibliographie

1 Herbert, V.: Drugs effective in megaloblastic anemias, in Goodman, L.S. and Gilman, A. (éd.): The Pharmacological Basis of Therapeutics, 5e édition, MacMillan Co., pp.1324–1349, 1975.
2 Ross, G.I.M.: Vitamin B12 in body fluids, Nature, 166:270, 1950.
3 Barakat, R.M., Ekins, P.: Assay of vitamin B12 in blood: A simple method, Lancet, i:25–26, 1961.
4 Rothenberg, S.P.: Assay of serum vitamin B12 concentration using Co57-B12 and intrinsic factor, Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 108:45–48, 1961
5 Rothenberg, S.P., DaCosta, M., Rosenberg, B.S.: A radioassay for serum folate: Use of a two-phase sequential incubation, ligand-binding system, New Eng. J. Med., 285(25):1335–1339,1972.
6 Gutcho, S., Mansbach, L.: Simultaneous radioassay of serum vitamin B12 and folic acid, Clin. Chem., 23:1609–1614, 1977.
7 Kolhouse, J.F., Kondo, H., Allen, N.C., Podell, A.B., Allen, R.H.: Cobalamin analogues are present in human plasma and can mask cobalamin deficiency because current radioisotope dilution assays are not specific for true cobalamin, New Eng. J. Med., 299(15):785–792, 1978.
8 BIO RAD Quantaphase B-12/Folate Radioassay Instruction Manual, mars 1995.
9 Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration – 29 CFR Part 1910.1030 – Occupational Safety and Health Standards. Bloodborne Pathogens. Fed. Register July 1, 1998;6:267–280.
10 Council Directive (90/679/EEC). Official J. of the Eur. Communites No. L374, 31 décembre 1990.
11 Documentation de Roche
12 NCCLS Proposed Standard: PSLA-12, Guidelines for Evaluating a B_{12} (COBALAMIN) Assay, mars 1980.
13 Passing H, Bablok W. A New Biometrical Procedure for Testing the Equality of Measurements from Two Different Analytical Methods. J Clin Chem Clin Biochem 1983;21:709–720.
14 Passing H, Bablok W. Comparison of Several Regression Procedures for Method Comparison Studies and Determination of Sample Sizes. J Clin Chem Clin Biochem 1984;22:431–445.
15 Bablok W et al. A General Regression Procedure for Method Transformation. J Clin ChemClin Biochem 1988; 26:783–790.

* Pour de plus amples informations, se référer au manuel d'utilisation des analyseurs Elecsys 2010 et E 170, au dossier Information-produit Vitamine B_{12} Elecsys et aux notices d'utilisation Vitamine B_{12} CalSet, PreciControl Universal et Diluent Universal.

= Modifications importantes. Les modifications concernant les données contenues dans le code barres doivent être entrées manuellement.

© 2001 Roche Diagnostics

Roche Diagnostics GmbH, D-68298 Mannheim

2001-07

1926306001 06 04